

# 红白花斑种皮高油酸花生种质材料的创制

闫丛丛<sup>1</sup>, 侯名语<sup>1</sup>, 崔顺立<sup>1</sup>, 刘立峰<sup>1</sup>, Luciano Josephy Harry Kazembe<sup>1</sup>,

杨鑫雷<sup>1</sup>, 孟庆荣<sup>2</sup>, 李文平<sup>2</sup>, 刘富强<sup>2</sup>, 穆国俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学/河北省作物种质资源实验室/教育部华北作物种质资源重点实验室, 保定 071001; <sup>2</sup>保定市农业科学院, 保定 071001)

**摘要:**本研究利用粉色种皮高油酸花生 G63 与紫白花斑种皮普通油酸花生 VG-01 配置杂交组合。利用等位基因特异性扩增(AS-PCR, allele-specific PCR)鉴定出 16 个 F<sub>1</sub> 真杂种。在 F<sub>2</sub> 中筛选到 *ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>* 单株, 并对 64 个 F<sub>2,3</sub> 家系间的种皮色泽分离进行  $\chi^2$  检测。结果表明, 纯色花生: 花斑花生在 0.05 水平上符合 9:7, 花生种皮花斑性状由 2 对互补基因控制, 当 2 对基因同时处于显性时, 种皮表现为纯色; 当 2 对基因至少有 1 对为隐性纯合时, 种皮表现为花斑。利用 AS-PCR 技术对 334 株花斑种皮 F<sub>3</sub> 单株进行基因型鉴定, 筛选到 29 株 *ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>* 基因型的单株。利用气相色谱测定结果表明, F<sub>4</sub> 种子油酸 GC 值介于 70.77% ~ 82.87%, 油酸/亚油酸介于 8.15 ~ 26.30。F<sub>4</sub> 群体植株主茎高 12.4 ~ 87.3 cm, 平均 57.2 cm, 较对照冀花 2 号增高 34.97%; 第 1 对侧枝长 91.6 ~ 196.3 cm, 平均 134.1 cm, 较对照冀花 2 号增长 34.28%。F<sub>5</sub> 新种质的单株果重、单株果数、单株仁重、单株仁数分别为 (27.16 ± 9.51) g、(22.11 ± 10.26) 个、(20.10 ± 7.17) g 和 (31.94 ± 15.16) 个。新种质 9-7、14-2、14-3、17-3 和 17-7 均为红白花斑种皮, 在单株果重方面较对照冀花 2 号增加 230.02%、165.80%、210.66%、200.65% 和 160.26%, 在单株果数方面增加 280.00%、340.00%、450.00%、210.00% 和 150.00%, 其油酸 GC 值分别为 80.54%、81.75%、80.63%、81.3% 和 81.56%。该批种质材料不仅油酸含量高, 而且具有医疗保健价值, 对丰富我国高油酸花生遗传多样性具有重要的现实意义。

**关键词:**花生; 高油酸; 花斑种皮; AS-PCR; 气相色谱

## Creation of High Oleic Acid Peanut Germplasm Materials with Red and White Variegated Seed Coat

YAN Cong-cong<sup>1</sup>, HOU Ming-yu<sup>1</sup>, CUI Shun-li<sup>1</sup>, LIU Li-feng<sup>1</sup>, Luciano Josephy Harry Kazembe<sup>1</sup>,

YANG Xin-lei<sup>1</sup>, MENG Qing-rong<sup>2</sup>, LI Wen-ping<sup>2</sup>, LIU Fu-qiang<sup>2</sup>, MU Guo-jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Agricultural University of Hebei/Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei/North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Ministry of Education, Baoding 071001; <sup>2</sup>Academy of Agricultural Sciences of Baoding, Baoding 071001)

**Abstract:** The hybridization composition, which parents was high oleic acid line G63 with pink seed coat and normal oleic acid line VG-01 with purple and white variegated seed coat, was used in this study. 16 true F<sub>1</sub> hybrids were identified by allele-specific PCR (AS-PCR) methods. The genotype *ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>* individuals were screened in F<sub>2</sub> population and the seed coat color segregation in 64 F<sub>2,3</sub> family lines was checked by Chi-square test. The results showed that the solid-color peanut: variegated color peanut was 9:7 at 0.05 level. The variegated seed coat was controlled by two pairs of complementary genes. When the two pairs of genes were dominant, the seed coat showed solid color. At least one pair of genes for recessive homologous, the seed coat showed variegated color. The genotypes of 334 F<sub>3</sub> plants with variegated seed coat were identified by AS-PCR, and 29 plants of *ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>* genotypes were selected. The results of gas chromatography showed that GC value of F<sub>4</sub> seed ranged from 70.77% to 82.87%, and oleic acid / linoleic (O/

收稿日期: 2016-11-22 修回日期: 2017-03-10 网络出版日期: 2017-04-21

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170421.0908.002.html>

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-14); 河北省科技支撑计划 (16226301D); 河北省高等院校科学技术研究重点项目 (ZH2011209); 山区特色杂粮轻简化生产关键技术研究示范 (17236405D-6); 河北农业大学作物学科梯队建设基金 (TD2016C301)

第一作者主要从事花生分子遗传育种研究工作。E-mail: cocoyancongcong@163.com

通信作者: 穆国俊, 研究方向为花生分子遗传育种及种质资源的利用。E-mail: mgj99999@126.com

L) ranged from 8.15 to 26.30. The main stem of  $F_4$  population was 12.4–87.3 cm, with an average of 57.2 cm, which was 34.97% higher than that of the control Jihua 2. The first pair of lateral branches was 91.6–196.3 cm, with an average of 134.1 cm, which was 34.28% higher than that of the control. Pod weight per plant, pod number per plant, kernel weight per plant and kernel number per plant were  $(27.16 \pm 9.51)$  g,  $(22.11 \pm 10.26)$ ,  $(20.10 \pm 7.17)$  g and  $(31.94 \pm 15.16)$ , respectively. The new germplasm lines (9-7, 14-2, 14-3, 17-3 and 17-7) were all red and white variegated seed coat. Compared with the control, pod weight per plant was increased 230.02%, 165.80%, 210.66%, 200.65% and 160.26%, respectively and pod number per plant was increased 280.00%, 340.00%, 450.00%, 210.00% and 150.00%, respectively. The oleic acid GC value was 80.54%, 81.75%, 80.63%, 81.30% and 81.56%, respectively. The new germplasm materials not only have high oleic acid content, but also have great health care value, which have great practical significance to enrich the genetic diversity of high oleic peanut in China.

**Key words:** peanut; high oleic; variegated seed coat; AS-PCR; gas chromatography

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是世界上重要的油料和经济作物, 是植物蛋白质和油脂的重要来源<sup>[1]</sup>。花生子仁中脂肪含量约占 50%, 其中油酸和亚油酸含量之和占脂肪含量的 80% 左右<sup>[2]</sup>。研究表明, 花生油含有的油酸、亚油酸等营养价值可与橄榄油相媲美<sup>[3]</sup>。油酸可以保护细胞免受过氧化氢诱导的氧化应激反应, 降低有害的低密度脂蛋白水平, 并维持有益的高密度脂蛋白水平, 从而有效预防冠心病等心血管疾病的发生<sup>[4]</sup>。油酸稳定性很高, 利于延长花生及制品的货架期。亚油酸是油酸在 FAD 催化下通过代谢脱氢生成的, 易于氧化酸败, 降低了油脂的稳定性, 促使花生变质变味, 对人体健康产生有害影响<sup>[5-6]</sup>。因此, 油酸/亚油酸值 (O/L, oleic acid / linoleic) 是花生品质育种的一项重要指标, 高油酸是创制花生新种质的主要品质目标之一<sup>[7]</sup>。

自 20 世纪 80 年代开展花生脂肪酸改良研究以来, 国内外育种工作者结合农艺和品质等方面的性状考查, 筛选出大量油酸含量高的花生种质资源, 为高油酸育种奠定了基础。在花生主要品质性状中, 油酸含量较蛋白质含量和脂肪含量是受环境因素影响最小的性状, 不易受环境和气候变化的影响<sup>[8]</sup>。高油酸花生的选育方法主要有突变育种、常规杂交回交育种及分子标记辅助选择等。1987 年, A. J. Norden 等<sup>[9]</sup>首次鉴定出 2 份高油酸自然突变体 F435-2-1 和 F435-2-2, 油酸含量分别为 79.91% 和 79.71%, O/L 分别为 37.34 和 34.81。S. Yu 等<sup>[10]</sup>从辐射突变体衍生后代中鉴定出 SPI 087、PI 098、PI 184 和 PI 2154, 其 O/L 均超过 15。C. Q. Fang 等<sup>[11]</sup>利用 1.0% EMS 浸泡的鲁丰 2 号种子, 种植后收获 M2 种子。通过近红外线模型筛选, 获得高油酸突变体 E2-4-83-12。姜慧芳等<sup>[12]</sup>通过远缘杂交获得

油酸含量达 64% 以上的 6 份新种质, 其脂肪酸变异差异远超过亲本。陈四龙等<sup>[13]</sup>以冀花 5 号作母本、开选 01-6 作父本进行杂交培育的冀花 11, 油酸含量高达 80.7%, O/L 为 26.03。程增书等<sup>[14]</sup>以冀花 6 号作母本, 开选 01-6 作父本, 通过有性杂交选育的冀花 13, 油酸含量为 79.6%, O/L 为 19.4。Z. Chen 等<sup>[15]</sup>采用 AS-PCR (Allele-specific PCR) 的方法在高油酸材料筛选中只可以辨别 *ahFAD2* 基因在 A 基因组和 B 基因组上的野生型和突变型, 很难区分各种基因型。H. T. Yu 等<sup>[16]</sup>利用该方法进一步确定了花生 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* 的各种基因型, 进而研究高油酸花生的遗传特性。李丽等<sup>[17]</sup>以常规品种白沙 1016、远杂 9847、冀 0212-2、海花 1 号与高油酸花生品系 CTWE 和 GYS01 杂交组配, 结合 AS-PCR 对油酸性状基因型进行确认, 创制了具有不同表型特征的中果型高油酸新材料 4 份。

目前在实际生产中, 高油酸花生均为粉色种皮, 外观表型与普通油酸花生无异。在大规模种植收获及油脂加工厂花生原料购进中, 容易造成人为混杂, 导致花生制品的油酸含量降低。花斑种皮高油酸花生种质材料在表型上易与常规品种区分, 能够保证高油酸花生的纯度, 具有一定的实际生产意义。本研究采用高代高油酸花生品系与常规花斑种皮品种配置杂交组合, 利用 AS-PCR 分子标记辅助选择的方法, 结合气相色谱检测, 以期获得兼具高油酸和花斑种皮的花生新种质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 亲本选配及选择** 粉色种皮高油酸花生 G63, 株型半匍匐, 油酸含量 72.8%、O/L 18.3, 来源于远杂 9847 × CTWE; 紫白花斑种皮普通油酸花生

VG-01,株型直立,油酸含量 45.2%、O/L 1.29,为河北农业大学花生育种研究室于 2010 年在自然群体中筛选到的自发突变体。2014 年 6 月配置正反杂交组合,母本材料种植于杂交池中,池高 70cm,父本材料种植方式同常规田间管理,株距 20 cm,行距 40 cm。同年 11 月,将 F<sub>1</sub>种植于海南省三亚市南滨农场,获得 F<sub>2</sub>种子。在 F<sub>2</sub>群体中,通过 AS-PCR 技术筛选同时具有 *ol*<sub>1</sub>和 *ol*<sub>2</sub>的单株,根据后代种皮颜色保留花斑种皮的种子。在 F<sub>3</sub>选择 *ol*<sub>1</sub>*ol*<sub>1</sub>*ol*<sub>2</sub>*ol*<sub>2</sub>单株,并保留花斑种皮种子,对 F<sub>4</sub>单株农艺性状进行调查,筛选获得花斑种皮高油酸 F<sub>5</sub>种质材料。

**1.1.2 仪器和试剂** 气相色谱仪(Agilent 7890A)、Naro drop 2000 微量分光光度计(Thermo Scientific 公司),Taq 酶、dNTP(TaKaRa 大连公司)、2 × Taq PCR Mix(CWBIO, Beijing, China)等试剂,其他试剂

均为进口或国产分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取** 花生基因组 DNA 的提取利用改良的 CTAB 法<sup>[18]</sup>,用微量紫外可见分光光度计检测提取的纯度与浓度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

**1.2.2 AS-PCR 反应** 根据 *ahFAD2A/ahFAD2B* 等位基因的差异设计 7 条引物,引物及检测方法参照李丽等<sup>[17]</sup>的研究。通过 4 个 AS-PCR 反应检测 *ahFAD2A* 的野生型 *OL*<sub>1</sub>和突变型 *ol*<sub>1</sub>,*ahFAD2B* 的野生型 *OL*<sub>2</sub>和突变型 *ol*<sub>2</sub>。反应体系为:12.5 μL 2 × Taq PCR Mix,引物按照表 1 所示,且各个引物浓度均为 10 μM,加水至总体积 25 μL。扩增程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,共 30 个循环,72 °C 延伸 15 min。

表 1 鉴定 *FAD2A/FAD2B* 基因型的 4 个 PCR 反应体系

PCR 反应		PCR 引物体积(μL) PCR primer volume						
PCR reaction		FAD2A-F	FAD2A-G	FAD2A-A	FAD2B-F	FAD2B-C	FAD2B-A	FAD2B-R
反应 I	Reaction I	1	1					0.25
反应 II	Reaction II	1		1				0.25
反应 III	Reaction III				1	1		0.25
反应 IV	Reaction IV				1		1	0.25

**1.2.3 花生农艺性状调查** 参考姜慧芳<sup>[19]</sup>对花生农艺性状调查的方法,调查项目包括单株主茎高,第 1 对侧枝长、分枝数、荚果形状、果嘴、单株果重、单株果数、单株仁重、单株仁数和种皮,以同期种植的冀花 2 号为对照。冀花 2 号单株产量性状的计算采用随机选取 5 株的平均值。

**1.2.4 遗传规律分析及验证** 利用自交结果,对 F<sub>2,3</sub>家系间的分离比进行  $\chi^2$  验证,  $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$ , *df* = 1, O: 观察值, E: 期望值。

**1.2.5 气相色谱检测** 参考胡晓辉等<sup>[20]</sup>方法并略有改进,测定油酸和亚油酸的气相色谱 GC 值,并计算 O/L 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交后代 F<sub>1</sub>真假杂种的鉴定

正交组合母本为高油酸材料,基因型为 *ol*<sub>1</sub>*ol*<sub>2</sub>,父本为普通油酸材料,基因型为 *OL*<sub>1</sub>*OL*<sub>1</sub>*OL*<sub>2</sub>,所收获的种子的种皮颜色全部表现为母本种皮颜色即粉色。采用鉴定 *OL*<sub>2</sub> 的 FAD2B-F/FAD2B-C 引物组合,利用反应 III 对真假杂种进行 AS-PCR 鉴定。真杂种存在 *OL*<sub>2</sub>,可以扩增获得 539 bp 的条带,而假杂种只存在 *ol*<sub>2</sub>,不能扩增出条带(图 1)。在正交组合中获得真杂种 11 株。

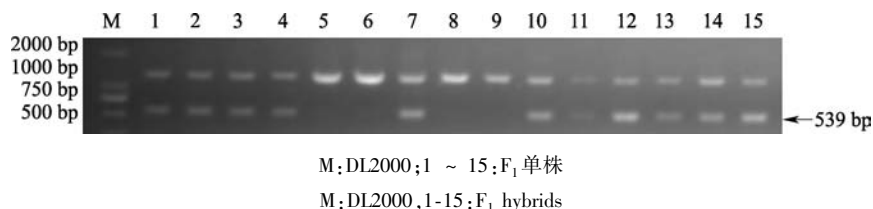
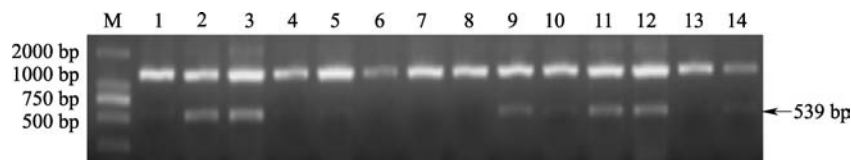


图 1 正交组合 F<sub>1</sub>真假杂种 AS-PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of true or false F<sub>1</sub> hybrids by AS-PCR in positive hybridization composition

反交组合母本为紫白花斑普通油酸材料,基因型为  $OL_1OL_1OL_2OL_2$ ,父本为粉色高油酸材料,基因型为  $ol_1ol_1ol_2ol_2$ ,所收获种子的种皮颜色全部表现为母本种皮颜色即紫白花斑,真杂种基因型为  $OL_1ol_1OL_2ol_2$ 。采用鉴定  $ol_2$  的 FAD2B-F/FAD2B-A 引物

组合利用反应 IV 对真假杂种进行 AS-PCR 鉴定。真杂种存在  $ol_2$ ,可以扩增获得 539 bp 的条带,而假杂种只存在  $OL_2$ ,不能扩增出条带(图 2)。在反交组合中获得真杂种 5 株。正、反交组合共获得真杂种 16 株。



M:DL2000;1 ~ 14:F<sub>1</sub>单株

M:DL2000,1-14:F<sub>1</sub> hybrids

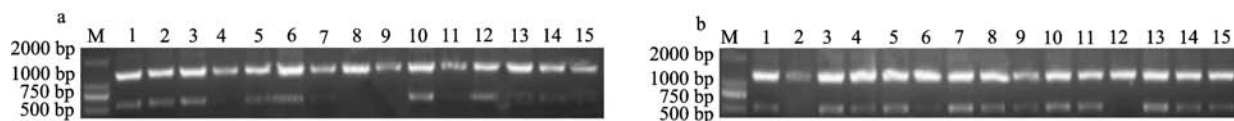
图 2 反交组合 F<sub>1</sub>真假杂种 AS-PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of true or false F<sub>1</sub> hybrids by AS-PCR in negative hybridization composition

## 2.2 F<sub>2</sub>群体 $ol_1ol_2$ 单株的鉴定

F<sub>2</sub>群体共 64 株,理论上共有 9 种基因型,只有同时具备  $ol_1$  和  $ol_2$  的单株其后代才有可能出现  $ol_1ol_2ol_2ol_2$  的高油酸类型。为了高效率的筛选  $ol_1ol_2ol_2ol_2$  隐性纯合体,利用 FAD2A-F/FAD2A-A 和 AD2B-

F/FAD2B-A 引物组合同时对 F<sub>2</sub> 单株进行 AS-PCR 鉴定,筛选携带  $ol_1ol_2$  基因型的单株(图 3)。结果表明,含有  $ol_1$  的单株占群体的 75.58%,含有  $ol_2$  的单株占群体的 74.09%,筛选到基因型  $ol_1ol_2$  单株 18 株,占群体的 29.07%。



a:检测 *ahFAD2A* 位点的突变基因  $ol_1$ ;b:检测 *ahFAD2B* 位点的突变基因  $ol_2$ ;1 ~ 15:F<sub>2</sub>单株的随机样本

a:Detection of mutated *ahFAD2A* to  $ol_1$ ;b:Detection of mutated *ahFAD2B* to  $ol_2$ ,1-15:Random samples of F<sub>2</sub> progenies

图 3 FAD2A-F/FAD2A-A 和 FAD2B-F/FAD2B-A 对 F<sub>2</sub>单株的 AS-PCR 鉴定

Fig. 3 The AS-PCR identification by FAD2A-F/FAD2A-A and FAD2B-F/FAD2B-A in F<sub>2</sub> population

## 2.3 F<sub>2,3</sub>家系种皮颜色遗传学分析

正交组合 F<sub>1</sub>种皮颜色为粉色,F<sub>2</sub>种皮颜色为红色。反交组合 F<sub>1</sub>种皮颜色为紫白花斑,F<sub>2</sub>种皮颜色为红色。F<sub>1</sub>种皮颜色由母本决定,与母本一致。F<sub>2</sub>种皮颜色由 F<sub>1</sub>基因型决定,正反交结果一致,推断花生种皮花斑性状由核基因控制。

F<sub>2,3</sub>家系花生种皮色泽出现紫色、红色、粉色、紫白花斑、红白花斑和粉白花斑的分离(图 4),将紫

色、红色、粉色合归为纯色类型,将紫白花斑、红白花斑和粉白花斑合归为花斑类型,根据种皮颜色按 9:7 的分离比例进行  $\chi^2$  验证,结果表明  $\chi^2 = 1.015$ ,  $P$  为 0.25 ~ 0.50,观察值与理论值差异不显著,二者相符合(表 2)。推断花生种皮花斑性状由 2 对互补基因控制。在 2 对基因同时处于显性时,种皮表现纯色;当 2 对基因中至少有 1 对为隐性纯合时,种皮表现为花斑性状。



图 4 F<sub>2,3</sub>家系花生种皮颜色

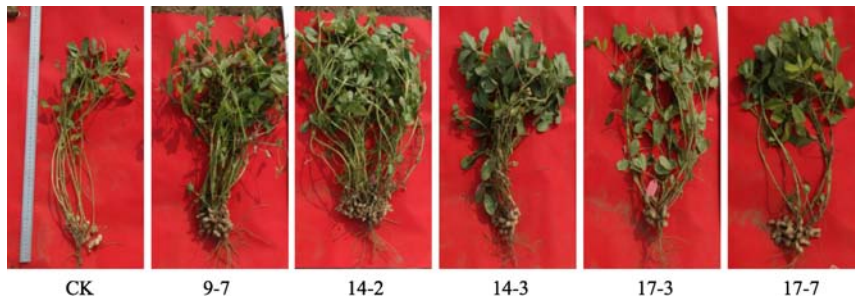
Fig. 4 Peanut seed coat color among F<sub>2,3</sub> family lines

表 2  $F_{2,3}$  家系种皮颜色遗传学分析Table 2 Genetic analysis of seed coat color in  $F_{2,3}$  family lines

项目 Item	纯色 Solid color			花斑 Variegated
	紫色 Purple	红色 Red	粉色 Pink	
观察值 O Observe	5	20	7	32
理论值 E Expectation		36		28
$\chi^2$	1.015			
P	0.25 ~ 0.50			

## 2.4 $F_3$ 单株的基因型分子鉴定

利用 AS-PCR 对  $F_3$  群体 334 单株进行分子鉴定, 共获得 9 种基因型。  $OL_1OL_1OL_2OL_2$  7 株, 占 2.10 % ;  $OL_1OL_1OL_2ol_2$  13 株, 占 3.89 % ;  $OL_1OL_1ol_2ol_2$  4 株, 占 1.20 % ;  $OL_1ol_1OL_2OL_2$  54 株, 占 16.17 % ;  $OL_1ol_1OL_2ol_2$  103 株, 占 30.84 % ;  $OL_1ol_1ol_2ol_2$  57 株, 占 17.07 % ;  $ol_1ol_1OL_2OL_2$  25 株, 占 7.49 % ;  $ol_1ol_1OL_2ol_2$  42 株, 占 12.57 % ;  $ol_1ol_1ol_2ol_2$  29 株, 占 8.68 % 。  $F_4$  种皮颜色有紫色、红色、粉色和花斑, 其中纯色占 56.87 % , 花斑占 43.13 % 。

图 5  $F_4$  不同表型特征的红白花斑种皮高油酸材料Fig. 5 Different phenotypic characteristics of high oleic acid with red and white variegated seed coat  $F_4$  population

$F_5$  荚果性状与亲本及对照的考察结果表明,  $F_5$  新种质的单株果重、单株果数、单株仁重、单株仁数分别为  $(27.16 \pm 9.51)$  g、 $(22.11 \pm 10.26)$  个、 $(20.10 \pm 7.17)$  g 和  $(31.94 \pm 15.16)$  个。9-7、14-2、14-3、17-3 和 17-7, 在单株果重方面较对照增加 230.02%、165.80%、210.66%、200.65 和 160.26%, 较 G63 除 9-7 增加 5.36% 外, 其余分别减少 15.1%、0.83%、4.02% 和 16.92%, 较 VG-01 增加 98.61%、59.97%、86.96%、80.94% 和 56.63%; 在单株果数方面较对照增加 280.00%、340.00%、450.00%、210.00% 和 150.00%, 较 G63 除 17-7 减少 3.85% 外, 9-7、14-2、

## 2.5 花斑种皮高油酸新种质的筛选

将种皮颜色为红白花斑同时基因型为  $ol_1ol_1ol_2ol_2$  的  $F_4$  种子, 进行气相色谱检测。对照冀花 2 号油酸含量占 38.51%, O/L 为 1.05。  $F_4$  油酸含量为 70.77% ~ 82.87%, 为对照的 1.84 ~ 2.15 倍, O/L 为 8.15 ~ 26.30。其中, 9-7 O/L 为 21.68, 14-2 O/L 为 8.57, 14-3 O/L 为 14.68, 17-3 O/L 为 8.43, 17-7 O/L 为 12.99。

对  $F_4$  植株进行田间性状考察, 对照冀花 2 号主茎高 43.28 cm, 第 1 对侧枝长 99.86 cm, 分枝数为 4 条。花斑花生植株主茎高变幅在 12.4 ~ 87.3 cm, 平均 57.2 cm, 较对照增高 32.16%; 第 1 对侧枝长变幅在 91.6 ~ 196.3 cm, 平均 134.1 cm, 较对照增长 34.29%; 分枝数为 4 ~ 12 条。其中 9-7 主茎高 87.3 cm, 第 1 对侧枝长 134.5 cm, 分枝数为 6 条; 14-2 主茎高 45.7 cm, 第 1 对侧枝长 126.3 cm, 分枝数为 10 条; 14-3 主茎高 42.4 cm, 第 1 对侧枝长 116.7 cm, 分枝数为 6 条; 17-3 主茎高 49.4 cm, 第 1 对侧枝长 128.4 cm, 分枝数为 6 条; 17-7 主茎高 62.1 cm, 第 1 对侧枝长 119.8 cm, 分枝数为 4 条 (图 5)。新种质较亲本 G63 主茎高降低 23.93%, 第 1 对侧枝长降低 3.11%; 较亲本 VG-01 主茎高增加 20.42%, 第 1 对侧枝长增加 36.00%。

14-3 和 17-3 分别增加 46.15%、69.23%、111.54% 和 19.23%, 较 VG-01 增加 111.11%、144.44%、205.56%、72.22% 和 38.89%; 在单株仁重方面较对照增加 249.39%、178.19%、217.04%、204.67% 和 190.16%, 较 G63 除 9-7 增加 9.02% 外, 其余分别减少 13.20%、1.08%、4.94% 和 9.46%, 较 VG-01 增加 101.70%、60.60%、83.02%、75.88% 和 67.51%。9-7、14-2、14-3、17-3 和 17-7 油酸 GC 值分别为 80.54%、81.75%、80.63%、81.3% 和 81.56% (表 3); 荚果形状为茧型或普通型, 果嘴轻微或中等, 种皮颜色均为红白花斑 (图 6)。

表3 F<sub>5</sub>花斑种皮高油酸材料脂肪酸基因型、表型特征及产量性状Table 3 The oleic acid genotypes, phenotypical characteristics and yield traits of F<sub>5</sub> high oleic acid lines with variegated seed coat

编号 Plant number	基因型 Genotype	荚果形状 Pod shape	果嘴 Pod beak	油酸(%) Oleic acid	亚油酸(%) Linoleic acid	单株果重(g) Pod weight per plant	单株果数 Number of pod per plant	单株仁重(g) Kernel weight per plant	单株仁数 Number of kernels per plant	种皮颜色 Seed coat color
9-7	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	茧形 Cocoon	轻微 Slight	80.54	1.48	45.84	38	34.45	54	红白花斑 Red and white variegated
14-2	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	茧形 Cocoon	中等 Medium	81.75	1.25	36.92	44	27.43	66	红白花斑 Red and white variegated
14-3	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	普通形 Common shape	轻微 Slight	80.63	2.84	43.15	55	31.26	73	红白花斑 Red and white variegated
17-3	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	普通形 Common shape	中等 Medium	81.3	2.69	41.76	31	30.04	42	红白花斑 Red and white variegated
17-7	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	茧形 Cocoon	中等 Medium	81.3	1.99	36.15	25	28.61	37	红白花斑 Red and white variegated
CK	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	普通形 Common shape	中等 Medium	38.51	36.71	13.89	10	9.86	15	粉色 Pink
G63	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	普通形 Common shape	中等 Medium	72.8	3.97	43.51	26	31.60	42	粉色 Pink
VG-01	<i>ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub></i>	普通形 Common shape	中等 Medium	45.2	35.04	23.08	18	17.08	27	紫白花斑 Purple and white variegated

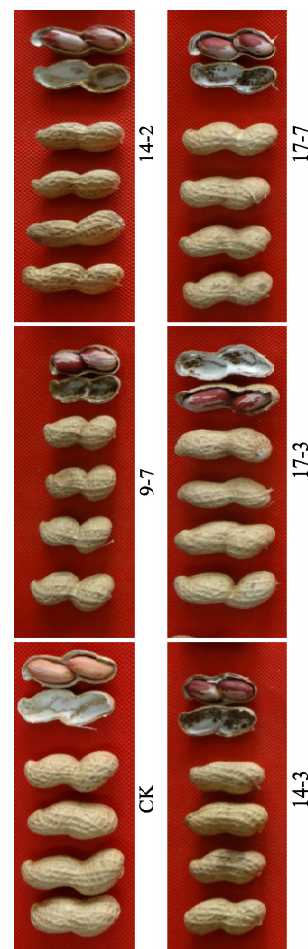


图6 红白花斑种皮高油酸种质材料荚果性状

Fig. 6 Pod traits of high oleic acid lines with red and white variegated seed coat

### 3 讨论

高油酸性状的分子遗传学机理的研究、高效的检测手段以及种质材料的获得是开展高油酸育种工作的主要因素。Y. Lopez 等<sup>[21]</sup>对高油酸花生和普通油酸花生的 *ahFAD* 序列比对发现,在 *ahFAD2A* 的编码区 448 位点 G 碱基突变为 A 碱基,在 *ahFAD2B* 的编码区 441 与 442 位点之间插入了一个 A 碱基。本试验所选用的高油酸亲本材料 G63 在 442 bp 位点存在 A 碱基插入,普通油酸含量亲本 VG-01 的 *FAD2B* 基因为野生型,无 A 碱基插入。因此,利用引物 FAD2B-A/FAD2-R,在反应 III 中可以扩增获得 539 bp 的特异性条带,而假杂种不存在 A 碱基的插入,不能扩增出条带。F<sub>1</sub> 后代在 1241 bp 全部出现条带,部分在 539 bp 处未出现条带,应为由于去雄不严格等原因导致的假杂种。AS-PCR 技术能够快速用于高油酸的鉴定,避免了由于假杂种造成的人力物力的浪费,提高了育种的选择效率,该结果与 C. T. Wang 等<sup>[22]</sup>的结论一致。对于高油酸基因型,若基因型只含 *ol<sub>1</sub>* 或 *ol<sub>2</sub>* 则可以在其后代中筛选到油酸含量为 54% ~ 60% 的中高油酸类型,若基因型 *ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>* 则可以在其后代中筛选到油酸含量为 68% ~ 74% 以上的高油酸类型<sup>[16]</sup>。常规 AS-PCR 技术,利用 4 类反应对 F<sub>2</sub> 单株进行分子鉴定,本试验只利用 2 对引物筛选出 *ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>* 基因型单株,淘汰其他的基因型,从而提高了筛选 *ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>* 基因型高油酸花生的概率。

在花生种皮遗传的研究中,已经建立了至少 12 个基本控制种皮颜色基因 (*F<sub>1</sub>*, *F<sub>2</sub>*, *D<sub>1</sub>*, *D<sub>2</sub>*, *R<sub>1</sub>*, *R<sub>2</sub>*, *R<sub>3</sub>*, *P*, *W<sub>1</sub>*, *W<sub>2</sub>*, *Wh<sub>1</sub>* 和 *Wh<sub>2</sub>*)<sup>[23]</sup>, 这些基因至少有 *V*, *Vsp<sub>1</sub>*, *Vsp<sub>2</sub>*, *Wsp<sub>1</sub>* 和 *Wsp<sub>2</sub>* 交互控制花斑种皮颜色。C. Mouli 等<sup>[24]</sup>通过褐色 × 粉红种皮颜色的亲本,揭示了控制紫色种皮颜色的 2 个隐性抑制基因。A. J. Norden 等<sup>[25]</sup>报道在 2 个白色珍珠豆 (*per-4* 和 *per-5*) 中,单基因显性上位基因控制种皮颜色的形成中的一个单显性基因。T. G. K. Murphy 等<sup>[26]</sup>发现当 *F<sub>1</sub>*, *F<sub>2</sub>* 和 *D<sub>1</sub>*, *D<sub>2</sub>* 两组完全显性复等位基因同时存在时,花生种皮为棕黄色或粉红色,如果有 1 组或 2 组复等位基因为隐性纯合基因型时,花生种皮为白色。梁炫强等<sup>[27]</sup>以深紫色种皮珍珠黑和粉红色种皮粤油 13 的杂交后代为材料,分析得到花生深紫色种皮颜色受一对不完全显性主效基因控制。庄伟建等<sup>[28]</sup>用自育的白皮 1 号品种与红皮良种粤油 116、汕油 71 和泉花 10 号进行杂交,得知花生种皮

白色性状是由 2 对隐性基因控制,独立遗传。本试验通过花斑种皮花生与粉色种皮花生正反交,F<sub>2</sub> 种皮颜色一致,说明是由核基因控制种皮颜色。在正交试验中,通过 F<sub>2,3</sub> 家系的种皮颜色遗传学分析,花斑性状由 2 对互补基因控制,呈现出纯色种皮与花斑种皮的分离比是 9:7。推断当 2 对基因同时处于显性时,种皮表现纯色;当 2 对基因至少有 1 对为隐性纯合时,种皮表现为花斑性状。该结果同 W. D. Branch 等<sup>[29]</sup>的结果不一致,他们发现单个不完全主导基因 *V* 控制花斑种皮花生 486GKP,*V* 基因抑制红色表皮层种皮全细胞的某些地区的表达,当为隐形纯合基因时,种皮为红色,这可能与选择的花斑材料不同有关。

本研究主要目标是筛选种皮颜色和高油酸性状。油酸及亚油酸的广义遗传力分别为 75.11% 和 75.00%,受环境影响较小,在早世代选择效率较高<sup>[30]</sup>。种皮颜色性状为核基因控制的质量性状,当代的种皮颜色由上一代植株基因型决定。因此,在 F<sub>2</sub> ~ F<sub>3</sub> 对这两个单位性状的重组进行选择是有效的。花生株高较高时,影响果针下扎,导致产量下降,因此株高是影响产量的主要因素之一<sup>[31]</sup>。本试验中,植株主茎高 12.4 ~ 87.3 cm,变幅较大,较对照增高 32.16%,是由于两亲本之一为匍匐型,故在田间进行筛选时淘汰主茎过高的直立植株,在其他性状良好的条件下,保留匍匐或株高较矮的直立植株。在 F<sub>3</sub> 中,由于群体较小,虽能够检测到 9 种基因型,但不符合一定的比例。为了提高后代的选择效率,凡是至少含有一对纯合显性基因的 *OL<sub>1</sub>OL<sub>1</sub>OL<sub>2</sub>OL<sub>2</sub>*、*OL<sub>1</sub>OL<sub>1</sub>OL<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>*、*OL<sub>1</sub>OL<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>*、*OL<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>OL<sub>2</sub>OL<sub>2</sub>* 和 *ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>OL<sub>2</sub>OL<sub>2</sub>* 可以直接淘汰;由于在 *OL<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>OL<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>*、*OL<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>*、*ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>OL<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>* 和 *ol<sub>1</sub>ol<sub>1</sub>ol<sub>2</sub>ol<sub>2</sub>* 后代中可以筛选到双隐形的高油酸基因型,可以保留继续种植。F<sub>4</sub> 收获单株,其中纯色占 56.87%,花斑占 43.13%,基本符合 9:7。对于花斑种皮基因与高油酸基因是否连锁,尚需进一步研究。

在种质创新工作中,种内杂交已被育种工作者广为采用<sup>[32]</sup>。国内高油酸花生品种自 2005 年至 2014 年主要通过种内杂交育成 14 个高油酸品种。2015 年冀花 16 号、花育 661、花育 663 和花育 962 等一批新的高油酸品种通过鉴定<sup>[33]</sup>。相比国外发达国家,我国高油酸花生育种进度还有待进一步提高。目前国内外高油酸花生品种中,关于花斑种皮高油酸新种质的研究尚未见报道。本研究以创制花斑种皮高油酸材料为目标,旨在以红白花斑种皮作

为高油酸花生品种的表型标识。红白花斑种皮高油酸花生新种质对于高油酸花生深加工企业具有极大的实用性。企业业主可以根据当地花生种植的实际情况,根据种皮颜色合理布局,可以在无需检测的情况下确保高油酸花生收购时的纯度,从而保证了高油酸花生制品的品质。本试验采用 AS-PCR 分子标记结合 GC 表型值筛选到优良的红白花斑种皮高油酸新材料,实现了高油酸花生种质资源创制与分子育种的紧密结合,解决了普通粉色种皮高油酸花生缺乏易于辨认的表型标记的缺陷,填补了花斑种皮高油酸花生的市场空白,对丰富我国高油酸花生遗传多样性具有重要的现实意义。

#### 参考文献

- [1] 孙大容. 花生育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1998
- [2] 陈静. 高油酸花生遗传育种研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):190-196
- [3] 姚云游. 花生油与橄榄油营养价值的比较[J]. 中国油脂,2005,30(4):66-68
- [4] Toborek M, Lee Y W, Garrido R, et al. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells[J]. Am J Clin Nutr,2002,75(1):119-125
- [5] Davis J P, Dean L O, Faircloth W H, et al. Physical and chemical characterizations of normal and high oleic oils from nine commercial cultivars of peanut[J]. J Am Oil Chem Soc,2008,85(3):235-243
- [6] 殷冬梅,胡晓峰,张苹果,等. 不同油酸亚油酸比值花生品种油酸脱氢酶基因的时空表达特征[J]. 中国油料作物学报,2013,35(2):137-141
- [7] 许燕,张绍龙. 我国高油酸花生育种研究进展[J]. 广东农业科学,2011,38(1):43-45
- [8] 严玫,韩锁义,董文召,等. 中国主要花生品种品质性状关联分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(6):1064-1071
- [9] Norden A J, Gorbet D W, Knauff D A, et al. Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program[J]. Peanut Sci,1987,14(1):7-11
- [10] Yu S, Pan L, Yang Q, et al. Comparison of the  $\Delta 12$  fatty acid desaturase gene between high-oleic and normal-oleic peanut genotypes[J]. J Genet Genomics,2008,35(11):679-685
- [11] Fang C Q, Wang C T, Wang P W, et al. Identification of a novel mutation in FAD2B from a peanut EMS mutant with elevated oleate content[J]. J Oleo Sci,2012,61(3):143-148
- [12] 姜慧芳,任小平,黄家权,等. 野生花生脂肪酸组成的遗传变异及远缘杂交创造高油酸低棕榈酸花生新种质[J]. 作物学报,2009,35(1):25-32
- [13] 陈四龙,李玉荣,程增书,等. 高油酸花生新品种冀花11号选育及其高效栽培技术[J]. 中国油料作物学报,2013,35(S):266-270
- [14] 程增书,李玉荣,陈四龙,等. 高油酸花生新品种冀花13号的选育研究[J]. 花生学报,2015,44(2):61-66
- [15] Chen Z, Wang M L, Barkley N A, et al. A simple allele-specific PCR assay for detecting FAD2 alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection[J]. Plant Mol Biol Rep,2010,28(3):542-548
- [16] Yu H T, Yang W Q, Tang Y Y, et al. An AS-PCR assay for accurate genotyping of FAD2A/FAD2B genes in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Grasasy Aceites,2013,64(4):395-399
- [17] 李丽,何美敬,崔顺立,等. 高油酸中果型花生新材料的创制与鉴定[J]. 中国农业科学,2014,47(19):3898-3906
- [18] 周浩,闫彩霞,郭凌超,等. CTAB 法少量快速提取花生基因组 DNA[J]. 山东农业科学,2012,44(7):8-9
- [19] 姜慧芳. 花生种质资源描述规范和标准制定的原则和方法[M]. 北京:中国农业出版社,2006
- [20] 胡晓辉,苗华荣,石运庆,等. 高油酸含量花生品种的多样性分析[J]. 花生学报,2013,42(1):35-40
- [21] Lopez Y, Nadaf H L, Smith O D, et al. Isolation and characterization of the  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines[J]. Theor Appl Genet,2000,101(7):1131-1138
- [22] Wang C T, Hu D Q, Ding F Y, et al. A new set of allele-specific PCR primers for identification of true hybrids in normal oleate  $\times$  high oleate crosses in groundnut[J]. J SAT Agric Res,2011,12(9):1-4
- [23] Branch W D. First 100 Years - inheritance of testa color in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Crop Sci,2011,51:1-4
- [24] Mouli C, Kale D M, Patel S H. Inhibition of purple seed coat color in groundnut[J]. Current Sci,1981,50:449-500
- [25] Norden A J, Knauff D A, Gorbet D W. A dominant gene for white seed coat in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. J Hered,1988,79:212-214
- [26] Murphy T G K, Reddy P S. Cytogenetics and Genetics of Groundnut[M]. Andover: Intercept Ltd.,1993:144-268
- [27] 梁炫强,洪彦彬,林坤耀. 花生深紫色种皮颜色基因的遗传分析及 SSR 标记[J]. 中国油料作物学报,2007,29(1):35-38
- [28] 庄伟建,刘思衡,蔡来龙. 白色种皮花生皮色及农艺性状遗传的研究[J]. 热带亚热带植物学报,1998,6(4):352-356
- [29] Branch W D, Hammons R O. Inheritance of testa color variegated in peanut[J]. Crop Sci,1979,19:786-788
- [30] Zhang X Y, Hu S J, Han S Y, et al. Inheritance of fat and fatty acid compositions in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Agric Sci Technol,2011,12(7):943-946
- [31] 吉明发,尚文成. 壮饱安与多效唑对花生株高和产量影响的比较[J]. 花生科技,2000(3):37
- [32] 徐春波,王勇,赵来喜,等. 我国牧草种质资源创新研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(5):809-815
- [33] 王传堂,王秀贞,唐月异,等. 中国高油酸花生种质创制、品种选育进展与建议[J]. 花生学报,2015,44(2):49-53